



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 616 035 A2**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 93116011.3

51 Int. Cl.⁵: **C12N 15/82, C12N 15/56,
C12N 15/29, A01H 5/00,
A01N 63/00**

22 Anmeldetag: 04.10.93

Der Anmelder hat nachträglich ein
Sequenzprotokoll eingereicht und erklärt, dass
dieses keine neuen Angaben enthält.

30 Priorität: 09.10.92 DE 4234131

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
21.09.94 Patentblatt 94/38

64 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI NL PT
SE

71 Anmelder: **Max-Planck-Gesellschaft zur
Förderung der Wissenschaften e.V.**
Bunsenstrasse 10
D-37073 Göttingen (DE)

72 Erfinder: **Logemann, Jürgen, Dr.**
Lavendeltuin 5
NL-2317 NB Leiden (NL)
Erfinder: **Jach, Guido**
Maternusstrasse 22
D-50678 Köln (DE)
Erfinder: **Görnhardt, Birgit**
Auf dem Knöpp 28
D-51145 Köln (DE)
Erfinder: **Mundy, John, Dr.**
NY Carlsberg Vej 6, 4th
1760 V Copenhagen (DK)
Erfinder: **Schell, Jeff, Prof.**
Carl-vonLinne-Weg 10
D-50829 Köln (DE)
Erfinder: **Eckes, Peter, Dr.**
Am Flachsland 18
D-65779 Kelkheim (Taunus) (DE)
Erfinder: **Chet, Ilan, Prof.**
Shikun Ezrachi
Nes Ziona 70400 (IL)

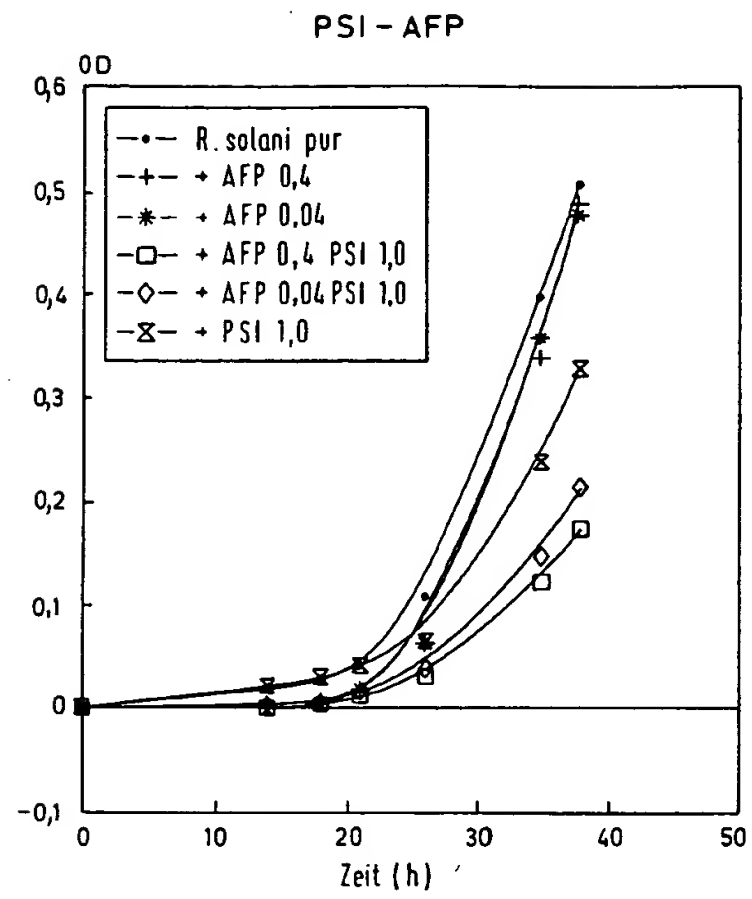
74 Vertreter: **von Hellfeld, Axel, Dr. Dipl.-Phys.**
Wuesthoff & Wuesthoff
Patent- und Rechtsanwälte
Schweigerstrasse 2
D-81541 München (DE)

54 Transgener Pathogen-resistenter Organismus.

57 Transgener pathogen-resistenter Organismus dessen Genom mindestens zwei unterschiedliche Gene unter Kontrolle aktiver Promotoren mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält. Dieser Organismus zeichnet sich durch eine synergistische pathogen-inhibierende Wirkung aus. Diese Wirkung tritt besonders dann auf, wenn die Gene für die Genprodukte Chitinase (ChiS, ChiG), Glukanase (GluG), Proteinsynthese-Inhibitor (PSI) und antifungales Protein (AFP) kodieren.

EP 0 616 035 A2

Fig. 1



Die Erfindung betrifft einen pathogen-resistenten Organismus sowie ein Verfahren zu dessen Erzeugung.

Im Stand der Technik ist bekannt, daß der Befall einer Pflanze durch Pathogene eine Reihe verschiedener Reaktionen hervorgerufen werden. Dazu gehören zum Beispiel Veränderungen in der Zellwandstruktur, die Synthese antimikrobiell wirkender Phytoalexine, die Akkumulation von sogenannten PR-Proteinen ("Pathogenesis-related"), Protease-Inhibitoren und Enzyme mit hydrolytischen Funktionen (Hahlbrock und Grisebach in Ann. Rev. Plant. Physiol., 30, (1979), 105-130).

Viele Pathogene (Pilze und Insekten) weisen als Bestandteil ihrer Zellwand Chitin auf. Demgegenüber besitzen Pflanzen kein Chitin. Es ist nun in einigen Fällen nachgewiesen worden, daß Pflanzen nach einem pathogenen Befall verstärkt Chitinasen produzieren. Chitinasen gehören zu den Enzymen mit hydrolytischen Funktionen und katalysieren den Chitinabbau. Es konnte nun gezeigt werden, daß Pflanzen durch die Produktion von Chitinasen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Pathogene erhalten.

Weiterhin ist die Verwendung eines Gens aus Gerstenpflanzen bekannt, dessen Genprodukt für einen Inhibitor der pilzlichen Proteinsynthese kodiert. Der Einbau eines entsprechenden Inhibitorgens in transgenen Pflanzen führte zu einer verbesserten Pilzresistenz.

Schließlich ist auch bekannt geworden, daß die Verwendung eines Polypeptids aus *Aspergillus giganteus* aufgrund dessen antifungaler Aktivität Pflanzen vor einem Pilzbefall schützen kann.

Gegenüber diesem Stand der Technik besteht aber das Bedürfnis nach der Schaffung weiterer transgener pathogen-resistenter Organismen. Daneben sind solche Organismen besonders erwünscht, deren Resistenz gegenüber den bekannten Organismen insgesamt vergrößert oder bezüglich der Anzahl der möglichen Pathogene verbreitert wird.

Dieses Problem wird durch einen transgenen pathogen-resistenten Organismus mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst.

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß der Einbau mindestens zweier unterschiedlicher Gene mit pathogen-inhibierender Wirkung in das Genom eines Organismus diesem zu einer Resistenz gegen Pathogene verhilft, die weit über eine additive Wirkung der Gene jeweils für sich hinausgeht.

In den Unteransprüchen werden weitere Ausführungsformen der Erfindung angegeben.

Die Gene können für Genprodukte kodieren, die die Vitalität von Pilzen herabsetzen. Insbesondere können die Gene pilzlichen, bakteriellen und pflanzlichen, tierischen oder viralen Ursprungs sein. Insbesondere haben die Genprodukte die Pilzresistenz fördernde Eigenschaften. Die Genprodukte sind Chitinase (ChiS, ChiG), Glukanase (GluG), Proteinsynthese-Inhibitor (PSI) und antifungales Protein (AFP).

Der transgene pathogen-resistente Organismus kann eine Pflanze sein, vorzugsweise handelt es sich um Tabak-, Kartoffel-, Erdbeer-, Mais-, Raps- oder Tomatenpflanzen.

Gegenstand der Erfindung sind auch DNA-Übertragungsvektoren mit inserierten DNA-Sequenzen, wie sie in dieser Beschreibung im einzelnen angegeben sind.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Erzeugung pathogen-resistenter Organismen, wie sie hier beschrieben werden, wobei in das Genom eines Organismus mindestens 1 Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung transferiert und der pathogen-resistente Organismus

(a) durch Kreuzung des Organismus mit einem gegebenenfalls transgenen weiteren Organismus, der mindestens ein anderes Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält, und anschließende Selektion und/oder

(b) durch Transformation dieses anderen Gens mit pathogen-inhibierender Wirkung in den Organismus erhalten wird. Das Verfahren kann mit DNA-Übertragungsvektoren mit inserierten DNA-Sequenzen entsprechend einem Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung, wie hier beschrieben, verwendet werden.

Schließlich ist ein Verfahren zur Erzeugung pathogen-resistenter Organismen Gegenstand der Erfindung, wobei zur Transformation in das Genom eines Organismus Vektoren verwendet werden, die mehr als ein Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung umfassen.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Gewährleistung der Resistenz von Organismen gegen Pathogene, dadurch gekennzeichnet, daß als Organismus ein transgener pathogen-resistenter Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder ein Organismus, dessen Genom mindestens ein Gen gemäß den hier verwendeten Definitionen (siehe Ansprüche 1 bis 7) enthält, verwendet und auf den Organismus mindestens eine Substanz aufgebracht wird, die nicht durch den Organismus exprimiert wird, aber irgendeinem anderen der Genprodukte gemäß den in dieser Anmeldung gegebenen Definitionen (Ansprüche 1 bis 7) entspricht.

Die synergistischen Wirkungen konnten ganz besonders mit transgenen pathogen-resistenten Organismen erzielt werden, auf die Gensequenzen transferiert oder transfiziert waren, die für Proteine der anhängenden Sequenzprotokolle A bis E kodierten bzw. diesen entsprachen.

ChiS:

Aus dem Bodenbakterium *Serratia marcescens* wurde ein 1,8 Kb großes DNA Fragment isoliert, daß für eine Chitinase, genannt ChiS, kodiert. In vitro Untersuchungen mit gereinigtem ChiS-Protein zeigten, daß es in geringen Konzentrationen bereits das Wachstum von Pilzen wirksam inhibieren kann. Die Ursache für die Inhibition ist, daß das ChiS-Protein über eine Chitinaseaktivität verfügt, mit der die Hyphenspitzen des Pilzes zerstört werden können. Auf diese Weise kann der Pilz nicht weiterwachsen und wird inhibiert.

PSI:

Das PSI-Gen stammt aus Gerste und kodiert für ein Protein, welches die Proteinsynthese von Pilzen inhibiert. Nach in vitro Tests reichen bereits geringe Konzentrationen PSI aus, um diverse Pilze wie zum Beispiel *Rhizoctonia solani* zu inhibieren.

AFP:

Aus der Fermentationsbrühe von *Aspergillus giganteus* kann ein Polypeptid isoliert und sequenziert werden, welches über antifungale Aktivität verfügt. Dieses Polypeptid eignet sich als antifungales Agens, z.B. als Sprühmittel und als Konservierungsstoff für technische Produkte und Nahrungs- und Futtermittel. Es kann weiterhin mit anderen pestizid wirksamen Stoffen, Düngemitteln oder Wachstumsregulatoren kombiniert werden. Inhibitorische Aktivitäten gegen Pilze konnten unter Anderem gegen verschiedene *Aspergillus*-, *Fusarien*-, *Phytophthora*- und *Trichophyton*-Arten nachgewiesen werden.

ChiG und GluG:

Aus bestimmten Gerstearten lassen sich zwei Gene isolieren, die für eine Chitinase (ChiG) bzw. Glukanase (GluG) kodieren. Gereinigtes ChiG-Protein oder GluG-Protein inhibiert in vitro diverse pflanzenpathogene Pilze (u.A. *Rhizoctonia solani*) (siehe R. Leah et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 266, No. 3 (1991), Seiten 1564-1573).

Die Erfinder haben nun völlig überraschend festgestellt, daß die mindestens zweifache kombinierte Expression von PSI, AFP, ChiS, ChiG oder GluG bezüglich der erworbenen Pilzresistenz bei transgenen Pflanzen zu synergistischen Effekten führt. Insbesondere werden die Wirkungen der Einzelsubstanzen in der Kombination deutlich übertroffen. Hierzu gehören die Resistenz gegen den Pilz *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia*-Befall, *Botrytis*-Befall usw.

Erfindungsgemäße Kombinationen sind (DNA und/oder Polypeptide):

(Zweierkombinationen)

ChiS, GluG; ChiS, PSI; ChiS, ChiG; ChiS, AFP; GluG, PSI; GluG, ChiG; GluG, AFP; PSI, ChiG; PSI, AFP;

(Dreierkombinationen)

ChiS, GluG, PSI; ChiS, GluG, ChiG; ChiS, GluG, AFP; GluG, PSI, ChiG; GluG, PSI, AFP; PSI, ChiG, AFP; ChiG, AFP, GluG

(Viererkombinationen)

ChiS, GluG, PSI, AFP; ChiS, GluG, PSI, ChiG;

(Fünferkombination)

Chis, GluG, PSI, AFP, ChiG

5 Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die kombinierte Verwendung der Proteine mit pathogen-inhibierender Wirkung, vorzugsweise ChiS, PSI, AFP, ChiG und GluG, gegen Pathogene. Kombinierte Verwendung bedeutet hier auch, daß mindestens eine erste pathogene inhibierende Substanz von dem Organismus exprimiert und mindestens eine zweite Substanz, die pathogen inhibierende Wirkung hat, von außen auf den Organismus aufgebracht wird.

10 Zu den erfindungsgemäßen Mitteln zählen auch jene, die die oben genannten Proteine in mindestens zweifacher Kombination enthalten. Die erfindungsgemäßen Mittel können neben den Proteinen weitere Wirkstoffe enthalten. Diese weiteren Wirkstoffe können Pestizide, Düngemittel und/oder Wachstumsregulatoren sein, die erfindungsgemäßen Mittel können zudem in unterschiedlichen Formulierungen bereitgestellt werden, wie Konzentrate, Emulsionen, Pulver, Formulierungen auf Trägerstoffen, Mischungen mit anderen
15 Wirkstoffen, etc. Besonders bevorzugt wird die Kombination ChiS/PSI und AFP/PSI. Diese Proteine können besonders wirksam zur Wachstumshemmung von Rhizoctonia solani, insbesondere bei Tabakpflanzenkulturen, eingesetzt werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung einer DNA-Sequenz in einem erfindungsgemäßen Verfahren, die mindestens für ein Polypeptid der Sequenzen A bis E kodiert, bzw. ein pathogen-resistenter
20 Organismus, wobei dessen Genom mindestens zwei unterschiedliche Gene unter der Kontrolle aktiver Promotoren mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält, wobei die Gene jeweils aus der Gruppe der Sequenzen A bis E ausgewählt sind. Die Erfindung schließt weiterhin DNA-Sequenzen ein, die mit einer DNA-Sequenz hybridisiert, welche für Polypeptide der Aminosäuresequenzen A bis E kodiert, wobei diese DNA-Sequenzen natürlichen synthetischen oder halbsynthetischen Ursprungs sein kann und mit der zuvor
25 genannten DNA-Sequenz durch Mutationen, Nukleotidsubstitutionen, Nukleotiddeletionen, Nukleotidinsertionen und Inversionen von Nukleotidfolgen verwandt sein kann und für ein Polypeptid mit pathogener Wirksamkeit kodiert. Gegenstand der Erfindung ist weiter noch ein rekombinantes DNA-Molekül, welches mindestens eine DNA-Sequenz nach den vorstehenden Ausführungen enthält, wobei dieses DNA-Molekül als Klonierungs- oder Expressionsvektor vorliegen kann.

30 Gegenstand der Erfindung sind entsprechende Wirtsorganismen und Zwischenwirte, die mit einem rekombinanten DNA-Molekül nach den vorstehenden Ausführungen transformiert sind. Als Zwischenwirt bei der Erzeugung eines pathogen-resistenten transgenen Organismus werden Bakterienstämme bevorzugt, insbesondere sogenannte Agrobakterienstämme.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen
35 transgenen pathogen-resistenten Organismen, insbesondere Tabak-, Kartoffel-, Mais-, Erbsen-, Raps- und Tomatenpflanzen.

Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen werden in der Regel zusammen mit einem Promotor transferiert. Promotorsequenzen werden vom pflanzlichen Transkriptionsapparat erkannt und führen somit zu einer konstitutiven Expression des mit ihnen verbundenen Gens in Pflanzen. Der Promotor kann aber auch
40 Pathogen-induzierbar und/oder verwundungs-induzierbar (WUN1) und/oder gewebespezifisch und/oder entwicklungsspezifisch sein.

Die zur Durchführung der Erfindung erforderlichen gentechnologischen Arbeiten, insbesondere zur Expression des Gens in Pflanzen, sind allgemein bekannt. Beispielsweise aus der Veröffentlichung von Maniatis et al. in "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbour (1982)

45 Die Erfindung wird in den folgenden Beispielen näher erläutert.

Alle molekularbiologischen Standard-Methoden wurden, sofern nicht anders angegeben, wie bei Maniatis et al. "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour, (1982) beschrieben, durchgeführt.

Die für die Aminosäuresequenzen A bis E kodierende DNA wurde zunächst in an sich bekannter Weise kloniert und dann durch Konjugation nach A. Tumefaciens LBA 4404 (A. Hoekema et al., Nature 303, 179-
50 180) transferiert. Dies geschah nach der von Van Haute et al. in EMBO J. 2, 411-418 (1983), beschriebenen Methode.

Die Überprüfung der DNA-Transfers in das Agrobakterium erfolgte durch die Isolierung von Agrobakterien-DNA nach der von Ebert et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 5745-5749 (1987), geschilderten Methode. Die Restriktionsspaltung der DNA, der Transfer auf Hybond-N-Membran (Amersham) und die
55 Hybridisierung gegen eine radioaktiv markierte DNA-Sonde gaben Aufschluß über einen erfolgreichen DNA-Transfer in das Agrobakterium.

Mittels des transformierten Agrobakteriums wurden wiederum Tabak-, Raps-, Erdbeer-, Tomaten- und Kartoffelpflanzen transformiert.

Die zur Infektion benötigten Agrobakterien LBA 4404 wurden in selektivem Antibiotika-Medium angezo-
gen (P. Zambrisky et al. in EMBO J., 1, 147-152 (1983)), durch Zentrifugation sedimentiert und in YEB-
Medium ohne Antibiotika gewaschen (YEB = 0,5% Fleisch-Extrakt; 0,2% Hefeextrakt; 0,5% Pepton; 0,5%
Saccharose; 2mM MgSO₄). Nach erneuter Sedimentation und Aufnahme in MgSO₄ konnten die Bakterien
5 zur Infektion verwendet werden.

Zur Infektion wurde die sogenannte Blattscheibenmethode eingesetzt.

Für die Blattscheiben-Infektion wurden sterile Blätter verwendet. Etwa 1 cm große Blattstücke werden in
die zuvor beschriebene Agrobaktériensuspension eingetaucht und anschließend auf 3MS-Medium überführt
(Medium nach T. Murashige und F. Skoog in Physiol. Plant., 15, 473-497 (1962); 3MS = MS + 3%
10 Saccharose). Nach zweitägiger Inkubation bei 16 Stunden Licht und 25 °C bis 27 °C wurden die Blattstücke
auf MSC16-Medium (nach T. Murashige (siehe oben); MSC16 = MS + 0,5 µg/ml BAP + 0,1 µg/ml NAA
+ 100 µg/ml Kanamycinsulfat + 500 µg/ml Claforan) überführt. Nach 4-6 Wochen erscheinende Sprosse
wurden abgeschnitten und auf MSC15-Medium (nach Murashige (siehe oben); MSC15 = MS + 2%
Saccharose, 500 µg/ml Claforan + 100 µg/ml Kanamycinsulfat) umgesetzt. Sprosse mit Wurzelbildung
15 wurden weiter analysiert.

Monokotyledone Pflanzen (u. a. Mais), zum Teil aber auch dikotyle Pflanzen wurden mittels direktem
Gentransfer in Protoplasten transformiert. Diese Protoplasten wurden anschließend zu intakten Pflanzen
regeneriert (Beispiel: J. Potrykus in Biotechnology 8 (1990) 535).

Die erhaltenen transgenen Pflanzen wurden zu Testzwecken mit dem Pilz *Rhizoctonia solani* infiziert.
20 Hierzu wurden Pilzkulturen gezüchtet und in Einheitserde gründlich vermisch. Diese Erde wurde dann in
einer Schale verteilt und mit den zu testenden Pflanzen bepflanzt.

Zur Auswertung wurde jeder Pflanze einer Schale ein Wert von 0 bis 3 zugeordnet. Daraus konnte für
jede Pflanzenlinie ein Index berechnet werden, der sich aus der Summe der Werte ergab. Die Einteilung ist
wie folgt:

- 25 0 = Ohne Symptome (gesund)
- 1 = leicht reduzierte Größe (gegenüber einer nicht-infizierten Kontrolle); kein bis sehr geringer
sichtbarer Befall
- 2 = starke Wachstumsreduktion; schwere Befallssymptome
- 3 = tot

30 Die Bewertung erfolgt jeweils 14 Tage nach Start der Versuchsreihe.

Beispiel 1:

Pilzinhibitionstest mit kombinierten Proteinen

35 Es sollte zunächst einmal gezeigt werden, daß die hier verwendeten Proteine in ihrer Kombination
synergistische Wirkungen haben. Hierzu wurden in vitro Pilzwachstumstests durchgeführt.

Hierbei wurde eine definierte Menge an *Rhizoctonia solani* Pilzmycel mit 100 µl-Kartoffel-Dextroselö-
sung versetzt und in Mikrotiterplatten bei 25 °C inkubiert. Dabei korreliert das Wachstum des Pilzes mit der
40 Zunahme der optischen Dichte bei 405 Nanometer linear. Die inhibierende Wirkung von Proteinen kann
anhand eines geringeren Anstiegs der optischen Dichte nachgewiesen werden.

Aus einer Flüssigkultur von *R. Solani* wurden 2-3 Mycelbällchen entnommen, in einem Eppendorfgefäß
mit 100 µl KGB-Medium versetzt und mit einem Glasmörser vorsichtig homogenisiert. Diese Suspension
wurde dann mit 10 ml KGB-Medium gemischt und durch ein steriles 100 µm Sieb gegeben. Die optische
45 Dichte dieser Mycelfragment-Suspension (100 µl-Aliquot) wurde durch Zugabe von Medium auf einen Wert
von 0,06-0,07 bei 405 Nanometer eingestellt. Je 100 µl wurden auf eine Mikrotiterplatte gegeben und mit
den zu testenden Proteinen versetzt. Pro Ansatz wurden 7 Parallelen gemessen. Als Kontrolle dienen
Ansätze, die mit den entsprechenden Mengen an Puffer versetzt wurden. Die Platten wurden über 48
Stunden bei 25 °C im Dunkeln inkubiert und die optische Dichte der Kulturen in regelmäßigen Abständen
50 gemessen.

Ob zwei Proteine bei der Wachstumshemmung des Pilzes in additiver synergistischer oder antagonisti-
scher Weise zusammenwirken, läßt sich aus den gemessenen Daten mit Hilfe der im folgenden beschriebe-
nen und allgemeinen angewandten Colby-Formel errechnen (S. R. Colby in Wheeds, 15 (1967), 20-22).

Hierzu war es zunächst notwendig, die bei einem additiven Verhalten theoretisch zu erwartende
55 Wachstumshemmung E (der erwartete Wirkungsgrad) zu berechnen. Dieser ist gegeben durch:

$$E = W1 + W2 - ((W1 \times W2)/100)$$

Dabei geben W1 und W2 die Wirkungsgrade der einzelnen Proteine an, worunter man die prozentuale Abweichung der Wachstumskurve (in Anwesenheit des Proteins) von der unbehandelten Kontrolle versteht. Der Wirkungsgrad für ein Protein ist (zu einem bestimmten Zeitpunkt der Wachstumskurve) gegeben durch:

5
$$W1 = (OD(K) - OD(P))/OD(K) \times 100 \quad (\text{Prozent})$$

Hierbei ist OD(K) die optische Dichte der unbehandelten Kontrolle und OD(P) die optische Dichte der mit dem Protein behandelten Kultur.

Bei der kombinierten Anwendung von zwei Proteinen waren somit folgende Aussagen möglich: Ist der
10 im Experiment gemessene Wirkungsgrad G gleich dem Erwartungswert E, so handelt es sich um ein additives Verhalten. Ist G hingegen größer als E, so liegt synergistisches Verhalten vor.

Unter Verwendung dieses Prüfmodells ergaben sich für die im Beispiel verwendeten Proteine ChiS, PSI, AFP, ChiG und GluG überraschenderweise synergistische Hemmeffekte gegen diverse Pilze, wobei diese Effekte sowohl durch die Kombination zweier Proteinarten, als auch durch die Mehrfachkombination
15 der obengenannten Proteine erreicht wurde.

Beispielsweise wurde aus der Kombination von ChiS und PSI-Protein, bzw. aus der Kombination von AFP- und PSI-Protein gegen den Pilz *Rhizoctonia solani* folgende Werte ermittelt (je zwei verschiedene ChiS und AFP-Konzentrationen bei konstanter RIP-Konzentration):

20 ChiS + PSI:

Die Erwartungswerte waren: E1 = 29,9% und E2 = 44,5%

Die gemessenen Werte waren: G1 = 60,4% und G2 = 64,1%

Die Proteine ChiS und PSI wirken also bei der Wachstumshemmung von *R. Solani* in synergistischer Weise
25 zusammen.

Die Fig. 1 zeigt die Ergebnisse, die mit der Kombination der Proteine, als auch mit den Einzelsubstanzen erhalten wurden. Nach der Figur werden verschiedene ChiS-Konzentrationen (0,5 µg/ml bzw. 0,05 µg/ml) mit PSI-Protein (1,0 µg/ml) kombiniert.

30 AFP + PSI:

Die Erwartungswerte waren: E1 = 39,9% und E2 = 41,9%

Die gemessenen Werte waren: G1 = 57,7% und G2 = 65,4%

Auch die Kombination AFP und PSI zeigt demnach eine synergistische Wachstumshemmung des Pilzes *R. Solani* an. In der Fig. 2 werden die Testergebnisse bei verschiedenen AFP-Konzentrationen (0,4 µg/ml bzw. 0,04 µg/ml) mit PSI-Protein (1,0 µg/ml) kombiniert angegeben.
35

Beispiel 2:

40 Transgene Pflanzen

Um die erfindungsgemäßen Organismen mit synergistisch zusammenwirkenden DNA-Sequenzen zu erhalten, wurden zunächst transgene Pflanzen erzeugt, die mindestens eines der synergistisch zusammenwirkenden Gene enthielten.

45

ChiS in transgenen Pflanzen

Es wurde zunächst ein ChiS-Gen mit pflanzlichen Regulations-sequenzen fusioniert.

Ein 1,8 Kb großes ChiS-Gen wurde durch die Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden nach der
50 Dideoxy-sequenzierungsmethode von Sanger et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, (1977), 5463-5467, sequenziert.

Der aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CamV) stammende 35S-Promotor (400 bp (nach Töpfer et al. in Nucl. Acid. Res., 15 (1987) 5890)) wurde transskriptionell mit dem ChiS-Gen fusioniert. 3' vom ChiS-Gen wurde das 0,2 Kb große Terminationssignal des 35S-Gens des CamV verwendet, dessen Funktionalität in
55 dikotylen Pflanzen bekannt ist. Das chimäre Gen 35S-ChiS wurde in den Vektor pLS034 kloniert, mittels des Agrobacterium tumefaciens-Transformationssystems in Tabak- und Kartoffelpflanzen transformiert und Kanamycin-resistente Pflanzen regeneriert.

In den erhaltenen Pflanzen konnte sowohl das ChiS-Gen als auch die entsprechende mRNA sowie das Genproduktprotein nachgewiesen werden.

PSI in transgenen Pflanzen

5

Aus reifen Gerstesamen (*Hordeum vulgare* L. cv. Piggy) wurde zunächst PolyA⁺ RNA isoliert und in einer cDNA-Genbank in λ -gt-11-Phagen abgelegt. Die Einzelheiten des Verfahrens sind R. Lea in Plant. Biol., 12 (1989), 673-682, zu entnehmen. Mit Hilfe monospezifischer PSI-Antikörper wurden dann cDNA-Klone identifiziert.

10

Im Anschluß daran wurden die PSI-positiven λ -gt-11-Phagen isoliert, weiter kloniert und nach der oben angegebenen Dideoxy-sequenzierungsmethode von Sanger et al. sequenziert. Die in *E. Coli* geklonte DNA wurde dann in der oben beschriebenen Weise durch Konjugation auf das Agrobakterium tumefaciens LBA4404 übertragen.

15

Sowohl das transferierte Gen als auch mRNA und Genprodukt konnten in entsprechenden transgenen Tabak-, Kartoffel-, Raps-, Erdbeer- und Tomatenpflanzen nachgewiesen werden.

AFP in transgenen Pflanzen

20

Die cDNA-Sequenz des antifungischen Peptids wird für die Klonierung im Vektor mit Enden versehen, die in BamH1- und Sal1-Restriktionsschnittstellen ligiert werden können. Als Klonierungsvektor wurde pDH51 (Pietrzak et al. in Nucl. Acids Res. 14 (1986), 5857) verwendet. Der Vektor pDH51 wurde mit den Restriktionsenzymen BamH1 und Sal1 zwischen Promotor und Terminator geöffnet. Der Vektor pDH51 ist ein pUC18-Derivat, das Promotor- und Terminatorsequenzen des 35S-Transkripts aus Blumenkohlmosaikvirus enthält. Diese Sequenzen werden vom pflanzlichen Transkriptionsapparat erkannt und führen zu einer starken konstitutiven Expression des mit ihnen verbundenen Gens in Pflanzen. Die DNA des antifungischen Peptids wird dann über die BamH1 und Sal1-Schnittstelle in den Vektor kloniert. Schließlich wird die Transkriptionseinheit - Promotor, Gen und Terminator - mit dem Restriktionsenzym EcoRI aus dem Vektor herausgeschnitten und in einen Pflanzentransformationsvektor kloniert. Als Pflanzentransformationsvektor können zum Beispiel folgende Vektoren bzw. ihre Derivate verwendet werden:

30

pOCA18 (Olszewski et al. in Nucl. Acids Res., 16 (1988), 10765) pPCV310 (Koncz und Shell in MGG 204 (1986), 383) und pBin19 (Bevan et al. Nucl. Acids. Res. 12 (1984) 8711)

Nachdem die Transkriptionseinheit und der Vektor über die EcoRI-Schnittstelle ligiert wurde, wurde das Konstrukt in den Agrobakterienstamm MP90RK (Koncz und Shell (siehe oben)) oder IHA101 (Hood et al. in J. Bacteriol. 168 (1986), 1291) konjugiert.

35

Transgene Tabak-, Kartoffel-, Erdbeer-, Raps- und Tomatenpflanzen wurden dann nach der oben beschriebenen Methode transformiert. Transformierte Sprosse werden aufgrund der mitübertragenen Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin selektioniert. Durch DNA-Analyse (Southern Blotting), RNA-Analyse (Northern Blotting) und Proteinanalyse mit spezifischen Antikörpern (Western Blotting) wurde die Expression des antifungischen Proteins in den transformierten Nutzpflanzen überprüft und bestätigt.

40

ChiG und GluG in transgenen Pflanzen

Analog zu den zuvor beschriebenen Pflanzen konnten ChiG- bzw. GluG-transgene Pflanzen erhalten werden, die sowohl Southern-, Northern- als auch Western-positiv waren.

45

ChiS, PSI, AFP, ChiG, GluG in transgenen monokotylen Pflanzen

50

Die zuvor genannten Gene konnten mittels direktem Gentransfer in das Genom monokotyler Pflanzen wie beispielsweise Mais integriert werden. Hierbei wurden transgene Pflanzen erhalten, die sowohl Southern- als auch Northern- und Western-positiv waren.

Kombination verschiedener Pilzresistenzgene in transgenen Pflanzen

55

Die zuvor erhaltenen Tabak-, Mais-, Raps-, Erdbeer-, Kartoffel- und Tomatenpflanzen wurden miteinander gekreuzt und auf Pflanzen selektioniert, die jeweils die Pilzresistenzgene beider Eltern beeinhalteten. Darüberhinaus wurden transgene Pflanzen dadurch erhalten, daß sie zunächst mit einem und dann mit einem oder mehreren weiteren Gen transformiert wurden. Schließlich wurden auch noch Pflanzen mit Vektoren transformiert, die verschiedene Resistenzgene beeinhalteten. Mit diesem Pflanzengut wurden

Pilzresistenztests gemacht. Überraschenderweise sind in allen Fällen nicht nur additive Effekte bezüglich der Pilzresistenz zu beobachten, sondern synergistische Effekte.

Beispielsweise zeigt eine Tabakpflanze, die ChiS und PSI exprimiert, eine wesentlich stärkere Widerstandsfähigkeit gegen Rhizoctonia-Befall als die Pflanzen, die entweder nur ChiS oder PSI exprimierten, oder die sich aus der additiven Widerstandsfähigkeit ergeben würde.

Ein synergistischer Hemmeffekt ergibt sich auch aus der kombinierten Expression von PSI- und AFP-transgenen Tabak gegen Rhizoctonia solani Befall. Auch die zwei- oder mehrfache Kombination verschiedener Gene (ChiS, RIP, AFP, ChiG und GluG) in den unterschiedlichsten transgenen Pflanzen führte zu synergistischen Hemmeffekten gegen diverse Pilze.

Während Wildtyppflanzen bei Tests mit 20 Sämlingen Indexwerte von 38 bis 46 aufweisen, erweist sich bei erfindungsgemäßen transgenem Tabak, daß dieser in Anwesenheit des Pilzes Rhizoctonia solani so gut wächst wie Kontrollpflanzen (Indexwert 10-12), die auf Rhizoctonia-freiem Boden kultiviert wurden.

Sequenzprotokoll A bzw. A' (AFP):

Seq IDNo.: 1 (A)
 Art der Sequenz: Vollständige Nukleotidsequenz mit entsprechendem Protein, soweit es durch ein offenes Ableseraster codiert wird, wirksames Protein (A')
 Sequenzlänge: 51 Aminosäuren (A')

Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: cDNA

Ursprüngliche Herkunft: Fermentationsbrühe von Aspergillus giganteus
 Name: Antifungisches Peptid (AFP)
 Merkmale (A):
 Offenes Ableseraster von 177 Nukleotiden, die N-terminale Aminosäure des wirksamen Proteins ist mit * markiert.

Eigenschaften: Antifungisches Agens, insbesondere gegen Rhizoctonia solani, verschiedene Aspergillus-, Fusarien- und Trichophyton-Arten.

A

5 TTGCCACCCCCGTTGAAGCCGATTCTCTCACCGCTGGTGGTCTGGATGCAAGAGATGAGA
 1 ----- 60
 AACGGTGGGGGCAACTTCGGCTAAGAGAGTGGCGACCACCAGACCTACGTTCTCTACTCT

 10 M Q E M R -
 OCGCGGGTTTTGGCCACATACAATGGCAAATGCTACAAGAAGGATAATATCTGCAAGTAC
 61 ----- 120
 CGCGCCCAAACCGGTGTATGTTACCGTTTACGATGTTCTTCCTATTATAGACGTTTCATG

 15 A R V L A T Y N G K C Y K K D N I C K Y -
 AAGGCACAGAGCGGCAAGACTGCCATTTGCAAGTGCTATGTCAAAAAGTGCCCCCGCGAC
 121 ----- 180
 TTCCGTGTCTCGCCGTTCTGACGGTAAACGTTACGATACAGTTTTTCACGGGGGCGCTG

 20 K A Q S G K T A I C K C Y V K K C P R D -
 GGCGCGAAATGCGAGTTTGACAGCTACAAGGGGAAATGCTACTGCTAGACGGTGAGCGAA
 181 ----- 240
 25 CCGCGCTTTACGCTCAAACGTGTCGATGTTCCCTTCACGATGACGATCTGCCACTCGCTT

 G A K C E F D S Y K G K C Y C •
 GGGACGAAGTAGGCTGGGGGTTATTTTACTCTGCT
 30 241 ----- 275
 CCCTGCTTCATCCGACCCCCAATAAAATGAGACGA

H

35 Ala-Thr-Tyr-Asn-Gly-Lys-Cys-Tyr-Lys-Lys-Asp-Asn-Ile-
 Cys-Lys-Tyr-Lys-Ala-Gln-Ser-Gly-Lys-Thr-Ala-Ile-Cys-
 40 Lys-Cys-Tyr-Val-Lys-Lys-Cys-Pro-Arg-Asp-Gly-Ala-Lys-
 Cys-Glu-Phe-Asp-Ser-Tyr-Lys-Gly-Lys-Cys-Tyr-Cys.

45

50

55

Sequenzprotokoll B bzw. B' (PSI):

5 Seq IDNo.: 2
 Art der Sequenz: Nukleotid mit entsprechendem Protein
 Sequenzlänge: 1078 Basenpaare (B' = unvollständiger
 PSI-cDNA-Klon)
 10 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Art des Moleküls: komplementär DNA
 15 Ursprüngliche Herkunft: Gerstesamen (Hordeum vulgare L.cv.
 Piggy)
 Unmittelbare experimentelle Herkunft: cDNA-Genbank in
 20 λ -gt-11-Phagen
 Name: Proteinsyntheseinhibitor
 Merkmale:
 42 bp-lange 5'-nicht-übersetzende Region
 25 Offenes Ableseraster von 843 Basenpaaren (das Stopcodon ist mit
 einem Sternchen markiert)
 193 basenpaarlanges 3'-nicht-übersetztes Ende,
 mögliche Polyadenylierungssignale sind unterstrichen
 30 Eigenschaften:
 Antifungal wirksam, insbesondere gegen Sporen von Trichoderma
 reesii und fusarium sporotrichoides sowie gegen Rhizoctonia
 35 solani.

CTTAATAGCACATCTTGTCCGTCCTTAGCTTTGCATTACATCCATGGCGGCAAGATGGCG
 * M A A K M A
 -1 1

AAGAACGTGGACAAGCCGCTCTTCACCGCGACGTTCAACGTCCAGGCCAGCTCCGCCGAC
 K N V D K P L F T A T F H V Q A S S A D
 10 20

TACGCCACCTTCATCGCCGGCATCCGCAACAAGCTCCGCAACCCGGCGCACTTCTCCAC
 Y A T F I A G I R N K L R N P A H F S H
 30 40

AACCGCCCCGTGCTGCCGCGGTCGAGCCCCAACGTCCCGCCGAGCAGGTGGTTCCACGTC
N R P V L P P V E P N V P P S R W F H V
50 60

5

GTGCTCAAGGCCTCGCCGACCAGCGCCGGGCTCAGCTGGCCATTCGGGCGGACAACATC
V L K A S P T S A G L T L A I R A D N I
70 80

10

TACCTGGAGGGCTTCAAGAGCAGCGACGGCACCTGGTGGGAGCTACCCCGGGCCTCATC
Y L E G F K S S D G T W W E L T P G L I
90 100

15

CCCGGCGCCACCTACGTCCGGTTCGGCGGCACCTACCGCGACCTCCTCGGCGACACCGAC
P G A T Y V G F G G T Y R D L L G D T D
110 120

20

AAGCTGACCAACGTGCTCTCGGCCGGCAGCAGCTCCCGGACGCGGTGACCGCCCTCCAC
K L T N V A L G R Q Q L A D A V T A L H
130 140

25

GGCGCACCAAGGCCGACAAGCCGTCCGGCCCCGAAGCAGCAGCAGGCGAGGGAGGCGGTG
G R T K A D K P S G P K Q Q Q A R E A V
150 160

30

CGACGCTGCTCCTCATGGTGAACGAGGCCACGCGGTTCAGACGGTGTCTGGGTTCGTG
T T L L L M V N E A T R F Q T V S G F V
170 180

35

SCCGGGTTGCTGCACCCCAAGGCGGTGGAGAAGAAGAGCGGGAAGATCGGCAATGAGATG
A G L L H P K A V E K K S G K I G N E M
190 200

40

AAGGCCAGGTGAACGGGTGGCAGGACCTGTCCGCGGCGCTGCTGAAGACGGACGTGAAG
K A Q V N G W Q D L S A A L L K T D V K
210 220

45

CCTCCGCGGGAAAGTCGCCAGCGAAGTTCGCGCCGATCGAGAAGATGGGCGTGAGGACG
P P P G K S P A K F A P I E K M G V R T
230 240

50

55

5 GCTGTACAGGCCGCCAACACGCTGGGGATCCTGCTGTTTCGTGGAGGTGCCGGGTGGGTTG
 A V Q A A N T L G I L L F V E V P G G L
 250 260

10 ACGGTGGCCAAGGCGCTGGAGCTGTTCCATGCGAGTGGTGGGAAATAGGTAGTTTCCAG
 T V A K A L E L F H A S G G K *

15 GTATACCTGCATGGGTAGTGTAAGTCGAATAAACATGTCACAGAGTGACGGACTGATA
 TAAATAAATAAATAAACGTGTCACAGAGTTACATATAAACAAATAAATAAATAATTAAA
 ATGTCCAGTTTA₄₇

20 B' /CGGTGACGACGCTGCTCCTCATGGTGAACGAGGCCACGCGGTTCCAGACGGTGTGCGGG
 A V T T L L L M V N E A T R F Q T V S G
 170 180

25 TTCGTGGCCGGGCTGCTGCACCCCAAGGCGGTGGAGAAGAAGAGCGGGAAGATCGGCAAT
 F V A G L L H P K A V E K K S G K I G N
 190 200

30 JAGATGAAGGCCCAGGTGAACGGGTGGCAGGACCTGTCCGCGGCGCTGCTGAAGACGGAC
 E M K A Q V N G W Q D L S A A L L K T D
 210 220

35 GTGAAGCCCCCGCCGGGAAAGTCGCCAGCGAAGTTCACGCCGATCGAGAAGATGGGCGTG
 V K P P P G K S P A K F T P I E K M G V
 230 240

40 AGGACTGCTGAGCAGGCTGCGGCTACTTTGGGGATCCTGCTGTTTCGTTGAGGTGCCGGGT
 R T A E Q A A A T L G I L L F V E V P G
 250 260

45 GGGTTGACGGTGGCCAAGGCGCTGGAGCTGTTTCATGCGAGTGGTGGGAAATAGGTAGTT
 G L T V A K A L E L F H A S G G K *
 270 280

50 TTGCAGGTATACCTGCATGGGTAAATGTAAAGTCGAATAAAATGTCACAGAGTGACGG
 ACTGATATAAATAAATAAATAAACATGTCATCATGAGTGACAGACTGATATAAATAAATA

Sequenzprotokoll C (ChiS):

5 Seq IDNo.: 3
 Art der Sequenz: Nukleotid
 Strangform: Einzelstrang (der aktivierte Strang ist
 Doppelstrang)
 10 Topologie: linear
 Art des Moleküls: cDNA
 Unmittelbare experimentelle Herkunft: Plasmid pLChiS aus dem E.
 Coli-Stamm A 5187
 15 Ursprüngliche Herkunft: Cosmidbank aus Serratia Marcescens
 Name: ChiS-Protein (Chitinase)
 Eigenschaften: Exo-Chitinase

20 (

```

1  CAGGGCGTTG TCAATAATGA CAACACCCTG GCTGAAGAGT GTGGTGCAAT
51  ACTGATAAAT ATTTATCTTT CCTTAATAGA AAATTCACTA TCCTTATTTG
25 101  TCATGTTTTT TTTTATTTAT ATGAAAATAA ATTCACGCTT GCTGAATAAA
    151  ACCCAGTTGA TAGCGCTCTT GTTTTTCGCG CTTTTTTATT TATAGTACTG
    201  AATGTACGCG GTGGGAATGA TTATTTTCGCC ACGTGGAAAG ACGCTGTTGT
30 251  TATTTATTGA TTTTAACCTT CGCGGATTAT TCGGAATTT TTTGCTTCG
    301  GCAATGCATC GCGACGATTA ACTCTTTTAT GTTTATCCTC TCGGAATAAA
    351  GGAATCAGTT ATGCGCAAAT TTAATAAACC GCTGTTGGCG CTGTTGATCG
35 401  GCAGCACGCT GTGTTCCGCG GCGCAGGCCG CCGCGCCGGG CAAGCCGACC
    451  ATCGCCTGGG GCAACACCAA GTTCGCCATC GTTGAAGTTG ACCAGGCGGC
40 501  TACCGCTTAT AATAATTTGG TGAAGGTAAA AAATGCCGCC GATGTTTCCG
    551  TCTCCTGGAA TTTATGGAAT GGCGACACCG GCACGACGGC AAAAGTTTTA
    601  TTAAATGGCA AAGAGGCGTG GAGTGGTCCT TCAACCGGAT CTTCCGGTAC
45 651  GGCGAATTTT AAAGTGAATA AAGGCGGCCG TTATCAAATG CAGGTGGCAC
    701  TGTGCAATGC CGACGGCTGC ACCGCCAGTG ACGCCACCGA AATTGTGGTA
    751  GCCGACACCG ACGGCAGCCA TTTGGCGCCG TTGAAAGAGC CGCTGCTGGA
50 801  AAAGAATAAA CCGTATAAAC AGAACTCCGG CAAAGTGGTC GGTTCCTTATT

```

55

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

851 TCGTCGAGTG GGGCGTTTAC GGGCGCAATT TCACCGTCGA CAAGATCCCG
901 GCGCAAAACC TGACCCACCT GCTGTACGGC TTTATCCCGA TCTGCGGCGG
951 CAATGGCATE AACGACAGCC TGAAAGAGAT TGAAGGCAGC TTCCAGGCGT
1001 TGCAGCGCTC CTGCCAGGGC CGCGAGGACT TCAAAGTCTC GATCCACGAT
1051 CCGTTGCCCC CGCTGCAAAA AGCGCAGAAG GGCCTGACCG CCTGGGATGA
1101 CCCCTACAAG GGCAACTTCG GCCAGCTGAT GGCCTGAAG CAGGCGCATC
1151 CTGACCTGAA AATCCTGCCG TCGATCGGCG GCTGGACGCT GTCCGACCCG
1201 TTCTTCTTCA TGGCGGACAA GGTGAAGCGC GATCGCTTCG TCGGTTCCGT
1251 GAAAGAGTTC CTGCAGACCT GGAAGTTCTT CGACGGCGTG GATATCGACT
1301 GGGAGTTCOC GGGCGGCAAA GGGCGCAACC CTAACCTGGG CAGCCCGCAA
1351 GACGGGGAAA CCTATGTGCT GCTGATGAAG GAGCTGCGGG CGATGCTGGA
1401 TCAGCTGTCT GTGGAAACCG GCCGCAAGTA TGAGCTGACC TCCGCCATCA
1451 GCGCCGGTAA GGACAAGATC GACAAGGTGG CTTACAACGT TCGCAGAAC
1501 TCGATGGATC ACATCTTCCT GATGAGCTAC GACTTCTATG GCGCCTTCGA
1551 TCTGAAGAAC CTGGGGCATC AGACCGCGCT GAATGCGCGG GCCTGGAAAC
1601 CGGACACCGC CTACACCACG GTGAACGGCG TCAATGCGCT GCTGGCGCAG
1651 GGCCTCAAGC CGGGCAAAAT CGTCGTGCGC ACCGCCATGT ATGGCCGCGG
1701 CTGGACCGGG GTGAACGGCT ACCAGAACAA TATTCCGTTT ACCGGCACCG
1751 CCACCGGGCC GGTAAAGGC ACCTGGAGA ACGGTATCGT GGAATACCGC
1801 CAAATCGCCG GCCAGTTCAT GAGCGCGGAG TGGCAGTATA CCTACGACGC
1851 CACGGCGGAA GCGCCTTACG TGTTCAAACC TTCCACCGGC GATCTGATCA
1901 CCTTCGACGA TGCCCGCTCG GTGCAGGCTA AAGGCAAGTA CGTGTGGAT
1951 AAGCAGCTGG GCGGCTGTT CTCCTGGGAG ATCGACGCGG ATAACGGCGA
2001 TATTCTCAAC AGCATGAACG CCAGCCTGGG CAACAGCGCC GGCCTTCAAT
2051 AATCGGTTGC AGTGGTTGCC GGGGATATC CTTTCGCCCC CGGCTTTTTC
2101 GCGGACGAAA GTTTTTTTTAC GCCGCACAGA TTGTGGCTCT GCGCCGAGCA
2151 AAACGCGCTC ATCGGACTCA CCCTTTTGGG TAATCCTTCA GCATTTCTTC
2201 CTGTCTTTAA CGGCGATCAC AAAAATAACC GTTCAGATAT TCATCATTCA
2251 GCAACAAAGT TTTGGCGTTT TTTAACGGAG TTAATAACCA GTAAGTTTGT
2301 GAAGGTCAGA CCAATGCGCT AAAAATGGG

Art der Sequenz: Nukleotid

Art des Moleküls: cDNA

Name: ChiG (Chitinase-G)

Merkmal:

63 pb-lange 5'-nicht übersetzende Anfangsregion, 798 pb offenes
Ableseraster, 152 pb-langes 3'-nicht übersetztes Ende, Ablese-
stopcodons sind mit einem Sternchen markiert, die wahrschein-
lichen Signalpeptidsequenzen sind unterstrichen, die abge-
leitete Aminosäuresequenz eines 26 kD-Chitinase Präproteins
mit 266 Aminosäuren ist unterhalb der Nukleotidsequenz ange-
geben, die unterstrichene AT-reiche Sequenz bei Position 905
ist wahrscheinlich ein Polyadenylierungssignal.

Eigenschaften:

Antifungal wirksam, insbesondere gegen *Trichoderma reesii* und *fusarium sporotrichoides* sowie *Rhizoctonia solani* und *Botrytis cinerea*.

D CCTACGACAGTACGGTAACGGTAACACCGACTACGGTACTCTGTGCTTTGTTGGCTCC 60

ACGATGAGATCCCTCGCCCTGGTGGCCCTGTACCCACGGTGCCCATGCCCATGCC 120
M R S L A V V V A V V A T V A M A I G
-20 -10

ACGGCGCGCGCGCGACGGCTGCTCTCCATCGTCTCGCGCGCGCACAGTTTCACCGCCATGCTTCTC 180
T A R G S V S S I V S R A Q F D R N L L
-1 1 10

CACCGCAACGACGGGGCCCTGCCAGGCCAAGGGCTTCTACACCTACGAGCGCTTCGTGGC 240
B R N D G A C D A K G I Y T Y D A F V A
20 30

CCCCCAGCCGCTTCCGGGGTTGGGACCACCGGCGAGCGCCGACGCCCCAGACGCGGAG 300
A A A A T P G T T G S A D A Q K R R

GTGGCCGCGCTTCTCTAGCACAGACCTCCACGACACCCACCGCGCGCTGGCGCACTGCACCG 360
V A A F L A Q T S E R T T G G W A T A P
60 70

GACGGGGCCTTCGGCTGGGGTACTGCTTCACGACGACCTGGCGGCTCTCGACTAC 420
D G A F A W G Y C F R Q E R G A S S D Y
 80 90

TGCACCCCGAGCGCACAAATGCCCGTGCCTCCCGGGAAGCGCTACTACGGCCCGCGGGGCA 480
 C T P S A Q W P C A P G E R Y Y G R G P
 100 110

ATCCAGCTCTCCCACTACAACTATGCACTGCCCCCCCCCATCGGGGTCCATCTG 540
I O L S E N Y F Y G P A G R A I G V D L
 120 130

5 CTGCCCCAACCCGGACCTGCTGCCCCACGGACGCCACTGTGCTTAAAGACGGCCATCTG 600
L A N P D L V A T D A T V G F K T A I W
 140 150

10 TTCTGATGACGGCCAGTCCCCCAAGCCATCGAGCCATGCTGTGATCGCCCCCACTG 660
F W N T A Q P P K P S S E A V I A G Q W
 160 170

15 AGCCCGTCAGGGGCTGACCGCCCCCAGGCCGGGTGCCCCGTTTGGTGTGATCACCAC 720
S P S G A D R A A G R V P G F G V I T N
 180 190

ATCATCAACGGCCCGCATCGCTGCGCTCACGGCCAGGACAGCCCGCTCGCCCATCGATC 780
I I N G E I E C G H G Q D S R V A D R I
 200 210

20 GGGTTTACAAAGCGCTACTGTGACATGCTCGGGCTTGGCTACGGCCACAACTGCAATGC 840
G F Y K R Y C D I L G V G I G N H L D C
 220 230

25 TACAGCCAGAGACCCCTTGGCTAATTAACTGCTATGTTAATCTTGGCCCTCCATAA 900
Y S Q R P F A *
 240

ATACAATAAGACCATCGTCTCTATCTACATGCTGTAAAGATGTAACTATGGTAACCTTT 960

30 ATCGGCAACATAACAAAGCCATCTCGTATAGATGCTTTGCTA₁₂ 1013

35
 40
 45
 50
 55

Sequenzprotokoll E (GluG):

5 Seq IDNo.: 5
 Art der Sequenz: Nukleotid mit entsprechendem Protein
 Sequenzlänge: 1249 Nukleotide
 Art des Moleküls: cDNA
 10 Ursprüngliche Herkunft: Gerstesamen (Hordeum vulgare L.)
 Name: GluG (Glukanase)
 Merkmale: 48 bp-lange 5'-nicht übersetzende Anfangsregion
 15 Offenes Ableseraster von 1002 bp
 199 pb-langes 3'-nicht übersetztes Ende,
 die unterstrichene At-reiche Sequenz bei den Position 1083 und
 1210 sind wahrscheinlich Polyadenylierungssignale,
 20 die abgeleitete Aminosäuresequenz des codierten Präproteins von
 334 Aminosäuren wird unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben.

E

```

25  GGCACCATTCATACCAATTCACCAACCACTACCTCTCTGCAACCAATCCCTACAAA  60
            M A R R
      -28

30  CATCTTCCCTCCATGCTTTCCCAATTCCTCTCTTCATTCCGACCAATTCCTGCTCTCTTACG  120
      D V A S M F A V A L L I S A F A A V P T
      -20 -10

35  AGTGTCCAGTCCATCCGCTATCTCTACGCGCTGATCCGCAACAACTCCGCTCCGCGAGC  180
      S V Q S I G V C Y G V I G M H L P S R S
      -1 +1 10

40  CACCTGCTCCAGCTCTACAGCTCCAAAGGCAATCAATCCATCTTACTTCCGCGAC  240
      D V V Q L Y R S K C I N G M R I Y F A D
      20 30

45  GCGCAGGCTCTCTGCGCGCTCCGCAACTCCGCAATCCGCTCATCTTCCACATCCGCAAC  300
      G Q A L S A V R N S C I G L I L D I G N
      40 50

50  CACCACTCCGCAACATCCGCGCTACGACCTCCAAAGGCGCTCTCTGCTCCAGAACAC  360
      D Q L A N I A A S T S N A A S W V Q N N
      60 70

55  CTGCGGCTTACTACCTGCGCTGCAACATCAACTACATCCGCGCGCGCAAGGCTCCAG  420
      V R P Y T P A V N I K Y I A A G N E V Q
      80 90

60  GCGCGCGCCACGCAAGCAATCTCTCGCGCGCAATCCGCAACTCCAAAGGCGCTCTCTCGCG  480
      G C A T Q S I L P A M R N L N A A L S A
      100 110
  
```

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

540
A G L C A I E V S T S I R F D E V A N S
120 130

600
F P P S A C V F E N A I M T D V A R L L
140 150

660
A S T G A P L L A N V Y P Y F A Y R D N
160 170

720
P C S I S L N Y A T F Q P G T T V R D Q
180 190

780
N N G L T Y T S L F D A M V D A V Y A A
200 210

840
L E K A G A P A V E V V V S E S C N P S
220 230

900
A G C F A A S A G N A R T Y N Q C L I N
240 250

960
E V C G C T P E E R E A L E T Y I P A M
260 270

1020
F N E N Q K T G D A T E R S F G L F N P
280 290

1080
D E S P A Y N I Q F
300

1140
T A A T A A T A A G C T G A C T A C T A C T A A T C C C A T C C A G T G T A A C T A G C A C T A

1200
C A T T C A T C A T C C A G A C T C C A C C A C C A T C C T T A C T T C T C T A T A C A T C A T

1249
C A T C G T A T C A T A A A G A T A T C C A A G A T C T A T A

55 Patentansprüche

1. Transgener pathogen-resistenter Organismus
dadurch gekennzeichnet, daß sein Genom mindestens zwei unterschiedliche Gene unter Kontrolle

aktiver Promotoren mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält.

2. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach Anspruch 1,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Gene für Genprodukte codieren, die die Vitalität von Pilzen herabsetzen.
3. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Gene pilzlichen, bakteriellen, pflanzlichen, tierischen oder viralen Ursprungs sind.
4. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach Anspruch 2 oder 3,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Genprodukte die Pilzresistenz fördernde Eigenschaften haben.
5. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach Anspruch 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Genprodukte
Chitinase (ChiS, ChiG), Glukanase (GluG), Proteinsynthese-Inhibitor (PSI) und antifungales Protein (AFP)
sind.
6. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch **gekennzeichnet**, daß dieser eine Pflanze ist.
7. Transgener pathogen-resistenter Organismus nach Anspruch 6, dadurch **gekennzeichnet**, daß es sich um eine Tabak-, Kartoffel-, Erdbeer-, Mais-, Raps- oder Tomatenpflanze handelt.
8. DNA-Übertragungsvektoren mit inserierten DNA-Sequenzen nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche.
9. Verfahren zur Erzeugung pathogen-resistenter Organismen nach einem der Ansprüche 1-7,
dadurch **gekennzeichnet**, daß in das Genom eines Organismus mindestens ein Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung transferiert und der pathogen-resistente Organismus
a) durch Kreuzung des Organismus mit einem gegebenenfalls transgenen weiteren Organismus, der mindestens ein anderes Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung enthält, und anschließende Selektion und/oder
b) durch Transformation mindestens eines anderen Gens mit pathogen-inhibierender Wirkung in den Organismus
erhalten wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch **gekennzeichnet**, daß DNA-Übertragungsvektoren mit inserierten DNA-Sequenzen entsprechend einem Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung, wie in einem der Ansprüche 1 bis 5 beschrieben, verwendet werden.
11. Verfahren zur Erzeugung pathogen resistenter Organismen nach einem der Ansprüche 1-7 ,
dadurch **gekennzeichnet**, daß zur Transformation in das Genom eines Organismus Vektoren verwendet werden, die mehr als ein Gen mit pathogen-inhibierender Wirkung umfassen.
12. Verfahren zur Gewährleistung der Resistenz von Organismen gegen Pathogene,
dadurch **gekennzeichnet**, daß als Organismus ein transgener pathogen-resistenter Organismus nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder ein Organismus, dessen Genom mindestens ein Gen gemäß der Definitionen der Ansprüche 1 bis 7 enthält, verwendet und auf den Organismus mindestens eine Substanz aufgebracht wird, die nicht durch den Organismus exprimiert wird, aber irgendeinem anderen der Genprodukte gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 entspricht.

Fig. 1

PSI - AFP

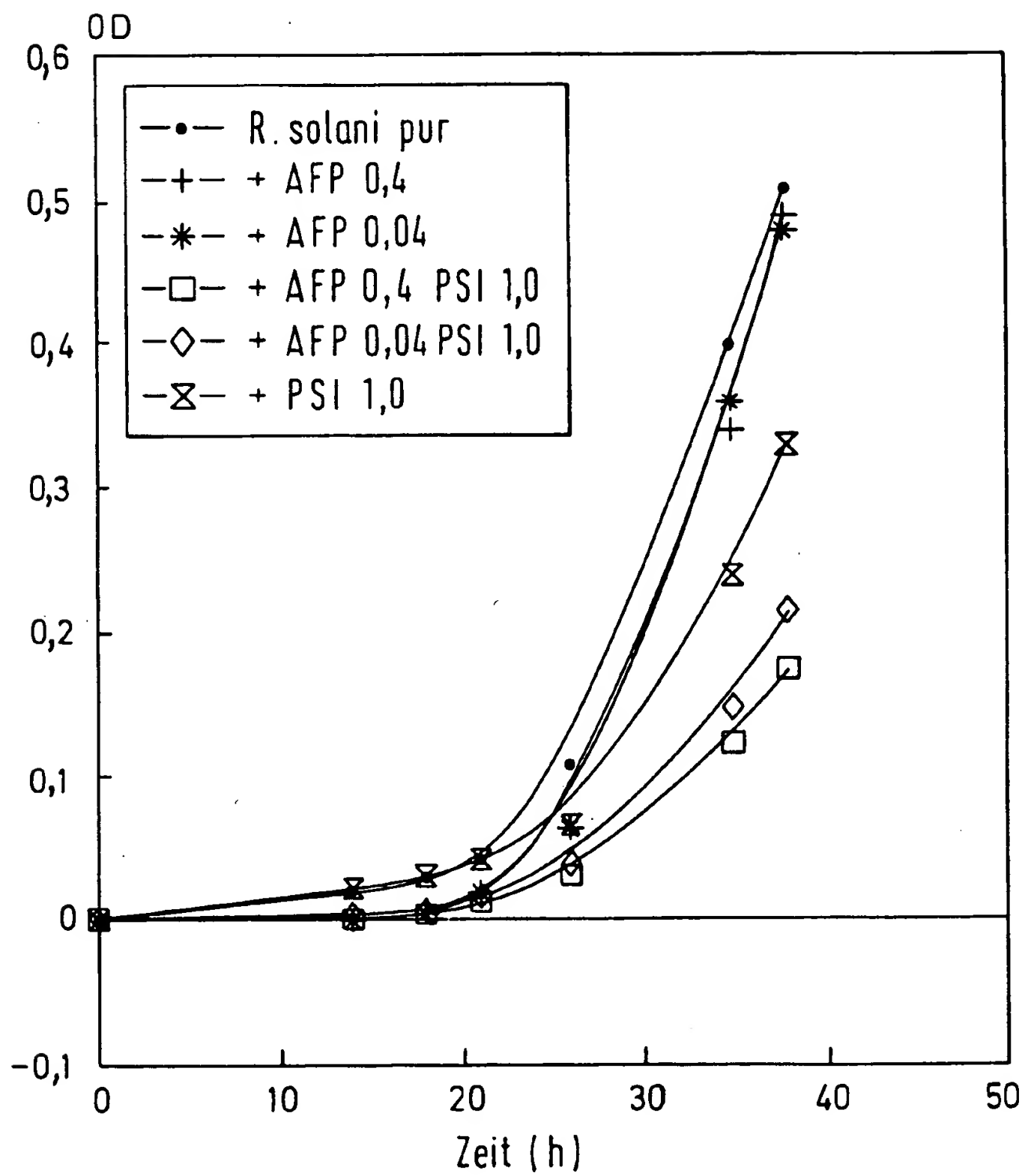


Fig. 2

ChiS + PSI

